

Partial Translation of Japanese Laid-Open Patent Publication No.10-84945

Date of Laid-Open: April 7, 1998

Application No. 8-247926

Filing date: September 19, 1996

Applicant: AJINOMOTO CO., INC.

Inventors: Satoshi Harashima et al.

Title of the Invention:

Method for analysis and breeding of a useful yeast by employing a splitting of chromosome at a specific site

Claims:

1. A method for producing yeast cells characterized by,
introducing a linear DNA fragment in a haploid yeast, wherein the linear DNA fragment has a structure in which a yeast centromere sequence, a marker gene that can be expressed in an yeast cell, and two telomere sequences arranged so that the ends of the telomere sequences face each other are flanked by two DNA sequences obtained by digesting a target sequence that is to be incorporated into the yeast chromosome,
selecting a yeast in which a homologous recombination was occurred between the target sequence and homologous region of the the target sequence of the yeast chromosome and the two telomere sequences are split.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-84945

(43) 公開日 平成10年(1998) 4月7日

(51) Int.Cl.⁵

識別記号

F I

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/19

A 2 1 D 8/04

A 2 1 D 8/04

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

A

// (C 1 2 N 1/19

C 1 2 R 1:865)

審査請求 未請求 請求項の数 11 図 0 表 (全 11 頁)

(21) 出願番号

特願平8-247926

(22) 出願日

平成8年(1996) 9月19日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成8年7月25日
社団法人日本生化学会発行の「生化学1996 V o 1.
68, N o. 7」に発表

(71) 出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(72) 発明者 原島 俊

大阪府高槻市上土室3-29-2 大阪大学
大学院工学研究科

(72) 発明者 向 由起夫

大阪府豊中市刀根山4-4 A-114

(72) 発明者 大嶋 泰治

大阪府高槻市日吉台二番町6-5 関西大
学工学部

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特定部位での染色体の分断化を利用した有用酵母の解析、育種法

(57) 【要約】

【課題】 有用形質に対する従来の酵母遺伝学による解析
手法には限界があり、これらの問題を解決しうる新規な
解析技術を提供する。

【解決手段】 染色体の任意の部位で一本の染色体を二本
あるいはそれ以上の数に分断し、分断染色体を保持した
一倍体酵母を作成する技術の開発。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 酵母セントロメア、酵母細胞内で発現するマーカー遺伝子、及び、末端が向き合うように配置された2つのテロメアが、酵母染色体上への組み込み標的DNA断片が切断されて得られる2つのDNAに挟まれた構造を有する直鎖上DNAを一倍体酵母細胞内に導入し、前記酵母染色体上への組み込み標的DNA断片と該DNAと相同な染色体上の領域との相同組み換えが生じてさらに前記染色体上での末端側が向き合うように配置された2つの酵母テロメアの解離が生じた酵母を選択することを特徴とする酵母の製造法。

【請求項2】 請求項1記載の工程に加え、分断された染色体の一方が脱落した酵母細胞を選択することを特徴とする酵母の製造法。

【請求項3】 請求項2記載の工程に加え、目的の形質を獲得した酵母細胞を選択することを特徴とする酵母の製造法。

【請求項4】 請求項2記載の工程に加え、分断された染色体のうち脱落した一方を同定することを特徴とする目的形質を支配する染色体領域を同定する方法。

【請求項5】 請求項4記載の方法によって同定された分断染色体の一方を、任意の酵母菌株に導入することを特徴とする酵母の製造法。

【請求項6】 請求項1記載の工程に加え、選択された酵母を異なる接合型の一倍体酵母と交雑させて二倍体酵母を得、その中から分断された染色体の一方が脱落した酵母を選択することを特徴とする酵母の製造法。

【請求項7】 請求項6記載の工程に加え、目的の形質を獲得した酵母を選択することを特徴とする酵母の製造法。

【請求項8】 請求項6記載の工程に加え、分断された染色体のうち脱落した一方を同定することを特徴とする目的形質を支配する染色体領域を同定する方法。

【請求項9】 請求項8記載の方法によって同定された分断染色体の一方を、酵母に導入することを特徴とする酵母の製造法。

【請求項10】 請求項1、2、3、5、6、7又は9記載の方法によって製造される酵母。

【請求項11】 請求項10記載の酵母を用いた飲食品の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、人工的に染色体が分断された酵母の製造法、分断された染色体の一方が脱落した酵母の製造法、目的の形質を獲得した酵母の製造法、目的形質を支配する染色体上の領域を同定する方法、染色体の一部が重複した酵母の製造法、及び上記方法によって得られた酵母を用いた飲食品の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】 出芽酵母サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) は日本酒、ビール、ワイン、パンなどの発酵食品の製造において、古来より重要な役割を果たしてきた。そして各々の食品において、食品の品質向上、製造工程での使いやすさ等の観点から実用酵母とよばれる優秀な生理機能を持つ酵母が分離、育種されてきた。

【0003】 しかし、従来の実用酵母は、目的の実用形質がどのような生理機能に由来するかが分からないものが多く、分離、育種に長い歳月を必要とするものであった。近年、遺伝子工学の進歩により、酵母の細胞機能が遺伝子レベルで急速に明らかになってきた。さらに、これら基礎原理の解明により、遺伝子操作技術を用いて実用酵母の育種を行った例も報告されつつある (Nakazawa et al., J. Ferment. Bioeng., 78巻, 6-11頁, 1994年)。

【0004】 そして近年、実用酵母研究に最新の技術が導入されるようになって大きく注目されるようになったのが、酵母の有用形質を支配する遺伝子は何か? という視点である。

【0005】 実用酵母の有用形質は人類が長年に渡って選りすぐってきた貴重な遺伝子資源であり、実用面での興味に加え、基礎生物学的観点からも大きな可能性を秘めている。ある有用形質を支配する遺伝子が同定されれば、これまで行われてきたランダムな変異処理や交雑による育種に比べ、その遺伝子を直接標的とした効率のよい育種系が設定できる事になり、このことによってもたらされる時間、労力面でのメリットは計り知れない。

【0006】 1996年4月、出芽酵母染色体の全塩基配列が決定された。その結果、酵母染色体上には6000を超える遺伝子が同定されたが、これまで発見されていなかった遺伝子が約2000存在することが分かった。この中には未だ解明されていない有用形質を支配する遺伝子も多く含まれていることが予想され、その機能には大きな関心が寄せられている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 しかし、全ゲノム塩基配列が明らかにされた現在でも、有用形質を支配する遺伝子の解明にはまだまだ大きな障害がある。

【0008】 それは、一般に有用形質には多くの遺伝子の関与が考えられ、従来の遺伝学的手法や遺伝子クローニング技術では支配遺伝子の同定が困難な場合が多いことである。有用形質に対する従来の酵母遺伝学による解析手法には限界があり、これらの問題を解決しうる何らかの新規な解析技術が求められている。

【0009】 そうした技術の一つとして、近年、酵母細胞を染色体レベルで改変し、有用性質を解析しようとする染色体工学技術の開発が行われている (川崎ら, 日本生物工学会誌, 第74巻, 11-16頁, 1996年)。

【0010】この技術は一つの染色体を丸ごと消去するという点で、遺伝子の大規模な改変が行えることや、表現系を相補する遺伝子のクローニングの場合に問題となる大量の形質転換体を取得する必要のないこと、そして減数分裂を介さずに酵母細胞の改変、解析が行えるなど、上記の問題点に解決策を与えうる一つの手法として注目されている。

【0011】しかし、この方法は染色体全体を対象とすることから有用形質と染色体の特定領域との関連がつきにくいこと、また有用形質をもたらす染色体上の特定領域をしぼり込むための解析手段としては充分ではない。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決すべく、染色体の任意の部位で一本の染色体を二本あるいはそれ以上の数に分断し、分断染色体を保持した一倍体酵母を作成する技術の開発に成功した。本願発明は同技術に基づくものであり、以下にこれを示す。

【0013】（発明1）酵母セントロメア、酵母細胞内で発現するマーカー遺伝子、及び、末端が向き合うように配置された2つのテロメアが、酵母染色体上への組み込み標的DNA断片が切断されて得られる2つのDNAに挟まれた構造を有する直鎖上DNAを一倍体酵母細胞内に導入し、前記酵母染色体上への組み込み標的DNA断片と該DNAと相同な染色体上の領域との相同組み換えが生じてさらに前記染色体上での末端側が向き合うように配置された2つの酵母テロメアの解離が生じた酵母を選択することを特徴とする酵母の製造法。

（発明2）発明1記載の工程に加え、分断された染色体の一方が脱落した酵母を選択することを特徴とする酵母の製造法。

（発明3）発明2記載の工程に加え、目的の形質を獲得した酵母を選択することを特徴とする酵母の製造法。

（発明4）発明2記載の工程に加え、分断された染色体のうち脱落した一方を同定することを特徴とする目的の形質を支配する染色体領域を同定する方法。

（発明5）発明4記載の方法によって同定された分断染色体の一方を、酵母に導入することを特徴とする酵母の製造法。

（発明6）発明1記載の工程に加え、選択された酵母を異なる接合型の一倍体酵母と交雑させて二倍体酵母を得、分断された染色体の一方が脱落した酵母を選択することを特徴とする酵母の製造法。

（発明7）発明6記載の工程に加え、目的の形質を獲得した酵母を選択することを特徴とする酵母の製造法。

（発明8）発明6記載の工程に加え、分断された染色体のうち脱落した一方を同定することを特徴とする目的の形質を支配する染色体領域を同定する方法。

（発明9）発明8記載の方法によって同定された分断染色体の一方を、酵母に導入することを特徴とする酵母の製造法。

（発明10）発明1、2、3、5、6、7又は9記載の方法によって製造される酵母。

（発明11）発明10記載の酵母を用いた飲食品の製造法。

【0014】

【発明の実施の形態】以下に本願発明について説明する。

【0015】（1）一倍体酵母における染色体の分断
セントロメアとは、有糸分裂時の染色体の移動の際、紡錘糸が結合する部分で、細胞分裂時の染色体の正常な複製と分配に重要な役割を果たす。本特許における酵母セントロメアに該当する遺伝子は、実施例に示したプラスミド上のCEN4に限らず、酵母染色体の複製と分配時にそれぞれセントロメアとしての機能を発揮しうる遺伝子部分であれば、全て該当する（参考文献：Hietterら、Cell、42巻、913-921頁、1985年）。

【0016】本特許における酵母細胞内で発現するマーカー遺伝子に該当する遺伝子は、実施例に示される遺伝子に限らず、酵母で用いられる抗生物質耐性付与遺伝子、酵母で用いられるアミノ酸、核酸代謝系遺伝子、さらには宿主の温度感受性を相補する遺伝子等、遺伝子の発現によって、非形質転換株に対し表現型において差異を生じせしめるものであればすべて該当する。

【0017】テロメアとは、直鎖状染色体の末端部分に存在する領域で、染色体複製の際に染色体の長さの維持に重要な役割を果たしている。本特許におけるテロメアに該当する遺伝子は、実施例に示したテトラヒメナ由来テロメアに限定されるものでなく、酵母染色体複製時にテロメアとしての機能を発揮しうる遺伝子部分であれば全て該当する（参考文献：Szostakら、Cell、29巻、245-255頁、1982年）。

【0018】組み込みの際の標的DNA断片に該当するDNAは、酵母の染色体由来であればどのような領域のDNAでも全て該当する。前述したように現在では酵母染色体の全塩基配列が解明されているので、分断化を試みる標的遺伝子領域は全てPCR等の方法で増幅し、分断化プラスミドに組み込めば染色体上の任意の部位で分断化が可能である。但し分断化標的遺伝子の取得法はこの方法に限られたものではなく、標的遺伝子も、酵母染色体上の全ての遺伝子若しくは酵母遺伝子と相同組み換えを起こしうる程度に塩基配列の相同性があるものも該当する。

【0019】酵母セントロメア、酵母細胞内で発現するマーカー遺伝子、及び、末端が向き合うように配置された2つのテロメアが、酵母染色体上への組み込み標的DNA断片が切断されて得られる2つのDNAに挟まれた構造を有する直鎖状DNAを調製するには、該直鎖上DNAを搭載する環状プラスミドベクターを作製して、これを例えばエシェリヒア属細菌細胞内で増幅した後制限酵

素で切断する。具体的には、後述の実施例に示されるようにプラスミドpDW10及びpDW18を制限酵素で切断することによって調製できる。

【0020】上記直鎖状DNAが導入される一倍体酵母とは、実施例に述べた実験室酵母YPH80に限定されるものでなく、 α 、 α の接合型、酵母の由来他に関わりなく一倍体であれば全て該当する。

【0021】上記直鎖状DNAを一倍体酵母細胞内に導入する方法は、従来の酢酸リチウム法をはじめ、エレクトロポレーション、パーティクルガン他の方法でもよい。

【0022】染色体の分断化が生じた酵母を選択するには、分断化プラスミドのマーカー遺伝子の性質に応じた選択培地に蒔き、マーカー遺伝子の発現しているクローンを単離する。その後染色体が目的の位置で正確に分断化されたことを、単離株から調製した染色体のパルスフィールド電気泳動、サザンブロット解析等で確認すればよい。

【0023】一倍体酵母細胞中に存在する分断化染色体の一方に酵母の生育に必須な遺伝子が存在しない場合には、その分断された染色体が、継代培養途上等生育の過程に酵母細胞から脱落してもその酵母は生存可能である。その結果、染色体の特異的領域が脱落した酵母をこの方法を用いて取得することができる。

【0024】染色体の特異的領域が脱落した酵母を得る方法を応用して、酵母の育種を行うこともできる。すなわち、染色体の特異的領域の脱落によって酵母の形質が変化し、有用な形質を持つ株が出現することが予想される。このことを利用して、様々な部位で染色体が分断化された酵母を、目的の有用形質を持つ酵母をスクリーニングする評価系にかけて、優秀な酵母を取得するというものである。この際の有用形質は発酵能、冷凍耐性、アルコール産生能他様々な有用形質が対象となりうる。

【0025】染色体の特異的領域が脱落した酵母を得た結果、優秀な有用形質を持った一倍体酵母の該有用形質の性能が低下する場合もありうる。その際に脱落した分断化染色体上には有用形質発現のカギを握る遺伝子がある。この原理に基づき、着目する有用形質をもたらす遺伝子を同定することができる。この技術により、実用酵母のもつ有用形質をもたらす遺伝子が存在する染色体領域の大まかな同定、絞り込みが可能になり、従来の酵母遺伝学手法による実用酵母の有用形質同定にかかる労力が大幅に軽減される。

【0026】後述の実施例に示されるとおり、一倍体酵母において、通常の染色体の他に、特定領域の染色体部分をミニ染色体として持つ酵母の作成も可能である。従って、例えば上述の方法で同定、取得された優秀な性質をもたらす染色体の特異的領域を通常の性能の一倍体酵母に導入することにより、有用形質の性能の向上した酵母を育種できる。該染色体特定領域を二倍体または、そ

れ以上の倍数性を有する酵母に導入することもできる。

【0027】上記技術を応用すべき酵母は例えばサッカロマイセス・セレビシエであり、実験室酵母はもとより、清酒、ワインなどの実用アルコール酵母、実用パン酵母他発酵食品に利用される酵母、さらには新たに自然界から取得した酵母であってもよい。

【0028】上記方法で育種された酵母は、酵母を利用する産業すべてに使用され、日本酒、ビール、ワイン、発泡酒その他アルコール発酵を用いるすべての産業において使用可能である。また、パンなどの発酵食品にも使用される。さらに、酵母そのものを用いた栄養食品、すなわち酵母エキス、パウダーその他の食品でも使用できる。

【0029】(2) 染色体が分断された一倍体酵母を掛け合わせて得られる二倍体酵母

ある優秀な実用形質をもつ一倍体酵母において染色体を特定な部位で分断化し、これを異なる接合型を有する染色体が分断されていない一倍体酵母と掛け合わせる。あるいは、ある優秀な実用形質をもつ一倍体酵母で異なる接合型を有する2種を使って、それぞれの染色体を分断化し、得られる2種の一倍体酵母を掛け合わせる。そのようにして得た二倍体酵母の分断された染色体の少なくとも一つを脱落させ、目的の有用形質をスクリーニングする系にかければ、所望の有用形質を保持するようになった株が現れる可能性がある。この方法は、一倍体酵母で染色体の特定部分を脱落させたときに懸念される生育に必須な遺伝子の脱落による酵母の致死化を懸念しなくて良い点でより優れた育種法である。

【0030】またこの考え方をさらに進めて、部分染色体の交換、“シャッフリング”も可能になる。その方法は、2種の一倍体酵母について一つ以上の部位で染色体の分断化を行い、それらを交雑後、様々な組み合わせで染色体領域の脱落した株を選択し、有用形質の向上した株を選択する育種法である。

【0031】分断された染色体の一部が脱落することにより有用形質が失われたクローンを選び出せば、有用形質をもたらす遺伝子が脱落染色体領域上にある事が分かる。また、逆に有用形質の発現を抑制する染色体領域の同定にも用いることができる。即ちこの方法は交雑能をもつ一倍体酵母で染色体分断化が成功したことにより可能になった新しい遺伝学的解析法であり、実用酵母のもつ有用形質をもたらす遺伝子の大まかな同定、絞り込みを可能にし、従来の酵母遺伝学手法を用いた実用酵母の有用形質同定にかかる労力を大幅に軽減できる可能性がある。さらに該方法は、二倍体酵母において減数分裂を介さずに行える解析法であることに大きな意義があると考えられる。従来の二倍体酵母の遺伝学的解析法では、ある形質がどのような遺伝子に支配されているかを解析する際に、四分子分析を行う。しかしその際に取得する酵母の孢子株は減数分裂による大規模な染色体上遺伝子

の再構成を経てしまっており、胞子株の染色体遺伝子構成はその親株と程遠いものに変化してしまっている。このことから実用上の酵母有用形質のように多くの遺伝子の関与が想定される遺伝形質の解析において、四分子分析を主体とする従来の遺伝学的解析法が適切であるかはこれまで大いに疑問視されてきた。本方法はそのような懸念を解消しうる方法として非常に意義深い。

【0032】上記の方法で同定された有用染色体領域を一倍体、二倍体もしくはそれ以上の倍数性をもつ酵母に導入し、有用形質の付与された酵母を育種できる。この技術を応用すべき酵母は例えばサッカロマイセス・セレビシエであり、実験室酵母はもとより、清酒、ワインなどの実用アルコール酵母、実用パン酵母他発酵食品に利用される酵母、さらには新たに自然界から取得した酵母であってもよい。

【0033】上記方法で育種された酵母は、酵母を利用する産業すべてに使用され、日本酒、ビール、ワイン、発泡酒その他アルコール発酵を用いるすべての産業において使用可能である。また、パンなどの発酵食品にも使用される。さらに、酵母そのものをを用いた栄養食品、すなわち酵母エキス、パウダーその他の食品でも使用できる。

【0034】以下に実施例にてさらに詳細に説明する。

【実施例】

(実施例1. GCN3遺伝子を用いた第XI番染色体の分断化) まず染色体分断化のためのプラスミドpCSV1の構築方法について述べる。まずSUP11遺伝子を含む制限酵素PvuI-SalI切断遺伝子断片(3.6kbp)をプラスミドp237(図1)から切り出し、その代わりにYIp5(一般に用いられる酵母染色体組込み用プラスミド、供給元: New England Biolabs社)を制限酵素PvuI-SalIで切断して得た遺伝子断片(2.4kbp)を導入した。この操作によって、構築の最終目的とするプラスミド上で不要なSUP11遺伝子を除去した。続いてこのプラスミドを制限酵素HindIII-BamHIで分解してp237由来のY'aとY'b遺伝子(最終構築プラスミドには不要の遺伝子部分)を含む遺伝子断片を除去し、残った遺伝子断片の両端をクレノウ酵素で平滑化後、XhoIリンカーを導入し、両端を連結して再環状化した。この際制限酵素BamHI認識部位が再生してしまい、後の操作に都合が悪いので、BamHIでこのプラスミドを分解後、切断末端をクレノウ酵素で平滑化し、再環状化してBamHI認識部位を無くした。最後にこのプラスミドのXhoI認識部位に、pYAC4より得た、HIS3遺伝子を挟んで逆向きにテロメア末端を持つ1.7kbpのXhoI遺伝子断片を導入し、これをpCSV1とした(図1及び図2)。なおプラスミドpCSV1で形質転換された大腸菌はpCSV1/HB101と命名されて、プライベート・ナンバーAJ

13226が与えられている。pCSV1/HB101(AJ13226)株は通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305 茨城県つくば市東1丁目1番3号)に平成8年8月19日付で寄託されており、その寄託番号はFERM P-15788である。

【0035】このpCSV1の制限酵素EcoRI認識部位に、pDW17由来のGCN3(第XI染色体上にある遺伝子、参考文献: Hanningら、Mol. Cell. Biol.、8巻、4808-4820頁、1988年)を含むEcoRI断片を導入したものがpDW18(図1)である。

【0036】pDW18をBamHIで切断してHIS3遺伝子部分を除去した遺伝子断片を単離し、T4リガーゼによりBamHI末端を連結させると、テロメア末端が向き合った形で再環状化する。この試料をGCN3遺伝子内にある制限酵素XbaI認識部位で切断し、一倍体酵母YPH80(ura3-52)(参考文献: Gerringら、Methods Enzymol.、194巻、57-77頁、1991年)の細胞内に酢酸リチウム法で導入する。このプラスミドを用いると、形質転換操作だけで染色体の分断化を起こすことができる(図3A)。染色体分断化に成功した酵母の選抜法であるが、一倍体酵母YPH80はURA3(ウラシル生合成系の酵素5-フルオロオロチジンモノリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子、文献: Roseら、Gene、29巻、113-124巻、1984年)に欠損があるため、ウラシルを含まない培地上では生育できない。しかしpDW18上にはURA3が組み込まれているため、染色体の分断化が起こったクローンは、pDW18由来のURA3の作用により、ウラシル非存在培地上でも生育できる。このような原理をもとに、染色体の分断化が起こったクローンの候補株を、ウラシル欠損培地上のコロニー形成能で選抜した。

【0037】選抜した酵母の染色体DNAをCarleらの方法(Carle et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82巻、3756-3760頁、1985年)によってアガロースブラグに包埋し、1%アガロースを含む0.5×TBEバッファーで作成したゲルに埋め込んだ。このサンプルに対しCHEFF DRIIシステムを用いてパルスフィールドゲル電気泳動を行い、染色体をゲル上で分離した(バッファー: 0.5×TBEバッファー、水温14°C、電圧200Vでまず24時間を45秒のスイッチングで行った後、6時間を15秒のスイッチングで行った)。電気泳動後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色し、DNAを観察した(図4)。図4左のレーン2がその結果で、分断化前の第XI染色体(矢印XI)がレーン1に、分断化染色体(矢印XI'、XI'')がレーン2に観察される。さらに目的染色体分断断片の確認のため、サザンブロッティングを行った。ゲルを0.25

Nの塩酸に30分間浸せきしたのち、0.5Mの水酸化ナトリウムで変性させ、中和し、ナイロンメンブレンにDNAをブロットした。このメンブレン上で、URA3遺伝子断片(1.1kb)、またはGCN3遺伝子断片(3.3kb)を「 α -32P」 dCTPを用いてランダムラベルを行ったプローブとハイブリダイゼーションさせ、目的のDNA断片の位置を確認した。図4において、分断化前の第XI染色体を矢印XIで、分断化後の第XI染色体断片をそれぞれ矢印XI'、XI''でしめす。図4左はエチジウムブロマイド染色の結果、図4中はURA3遺伝子断片(1.1kb)をプローブにして行ったサザンブロッティングの結果、そして図4右はGCN3遺伝子断片(3.3kb)をプローブにして行ったサザンブロッティングの結果である。

【0038】この結果、取得した29株のうち、8株が目的の部位で第XI染色体が分断化して生じた二本の染色体を保持している事が分かった。この第XI染色体分断化酵母のうちの1株をYMR431と命名した。YMR431株にはプライベート・ナンバー AJ14719が与えられ、また、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に平成8年8月19日付で寄託されており、その寄託番号はFERM P-15789である。

【0039】(実施例2. YHR088遺伝子を用いた第VIII番染色体の分断化) pCSV1の制限酵素EcoRI認識部位に、YHR088(第VIII染色体上にある遺伝子、参考文献: Johnstonら、Science、265巻、2077-2082頁、1994年)を含むEcoRI断片を導入したものがpDW10である(図1)。pDW10を上述と同様の方法で処理した後、YHR088遺伝子内にある制限酵素BglII認識部位で切断し、pDW18の場合と同じく酵母YPH80に導入し、前出の原理でウラシル非要求性を基に染色体分断化クローンを選抜した。図3BにpDW10を用いた染色体分断化機構を図示した。

【0040】選抜した酵母の染色体DNAをCarleらの方法(Carle et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82巻、3756-3760頁、1985年)によってアガロースブラグに包埋し、1%アガロースを含む0.5×TBEバッファーで作成したゲルに埋め込んだ。このサンプルに対しCHEFF DRIIシステムを用いてパルスフィールド電気泳動を行ない、染色体をゲル上で分離した(バッファー: 0.5×TBEバッファー、水温14°C、電圧200Vでまず20時間を45秒のスイッチングで行った後、24時間を20秒のスイッチングで行った)。電気泳動後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色し、DNAを観察した(図5)。図5左のレーン2がその結果で、分断化前の第VIII染色体(矢印VIII)がレーン1に、分断化染色体(矢印VIII'、VIII'')がレーン2に観察される。さらに目的染色

体分断断片の確認のため、サザンブロッティングを行った。ゲルを0.25Nの塩酸に30分間浸せきしたのち、0.5Mの水酸化ナトリウムで変性させ、中和し、ナイロンメンブレンにDNAをブロットした。このメンブレン上で、URA3遺伝子断片(1.1kb)、またはYHR088遺伝子断片(3.7kb)を「 α -32P」 dCTPを用いてランダムラベルを行ったものとハイブリダイゼーションさせ、目的のDNA断片の位置を確認した。図5において、分断化前の第VIII染色体を矢印VIIIで、分断化後の第VIII染色体断片をそれぞれ矢印VIII'、VIII''でしめす。図5左はエチジウムブロマイド染色の結果、図5中はURA3遺伝子断片(1.1kb)をプローブにして行ったサザンブロッティングの結果、そして図5右はYHR088遺伝子断片(3.7kb)をプローブにして行ったサザンブロッティングの結果である。

【0041】この方法で取得した29株のうち、5株が目的の位置で第VIII染色体が分断化されて生じた二本の染色体を保持していた。この第VIII染色体分断化酵母の一つをYMR432と命名し、これにプライベート・ナンバー AJ14720を与えた。YMR432(AJ14720)は通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に平成8年8月19日付で寄託されており、その寄託番号はFERM P-15790である。

【0042】(実施例3. 染色体分断酵母と親株との増殖能の比較) さらに、染色体を分断することにより酵母が受ける生理学的な影響について調べた。方法は、親株(YPH80)、第XI染色体が分断化された形質転換株(YMH431)、及び第VIII染色体が分断化された形質転換株(YMH432)を30°CでYPD培地で一晚培養した後、100mlの同培地にO.D. 600が0.2になるよう接種し、30°Cで培養時の菌体量の増加を調べた(図6)。その結果、染色体分断株は二株とも親株よりやや増殖が盛んであった。この結果より、本染色体分断化法は、細胞増殖の点では酵母の生理状態に悪影響を与えないことが示唆された。

【0043】

【発明の効果】本発明者らは染色体の任意の部位で一本の染色体を二本に分断し、その両方の分断染色体を保持した一倍体酵母を作成する技術の開発に成功した。この技術は一倍体酵母における新規な育種法を提供するのみならず、酵母の有用形質遺伝子の染色体上での位置の大きな絞り込みを可能にし、従来の遺伝学的解析手法にかかる労力を大幅に軽減する可能性がある。また、このような染色体の分断化が一倍体酵母で成功した事により、交雑株及びそれより生成する分断染色体の脱落株を応用して、有用形質をもたらす染色体領域を同定し、これを他に導入することにより、性能の向上した酵母を育種できる。また一倍体細胞の染色体分断化技術は、染色体の部分的交換、"シャッフリング"も可能にし、染色

体脱落とこの方法を組み合わせて実用酵母の新規スクリーニング法としても応用可能である。この方法の利点は、減数分裂を経ずに染色体の特定領域の再構成を行えることから、有用遺伝子の組み合わせを乱すことがない。このことは、一倍体酵母の有用形質をもとに部分染色体レベルで二倍体酵母の目的形質を設計しつつ育種ができることを意味しており、ポストシーケンシング時代の実用酵母育種技術として大いに期待される技術であると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 使用プラスミドの構造図

【図2】 染色体分断化プラスミド pCSV.1 の構築図

【図3】 染色体分断化の機構図 (A: pDW18 による第XI染色体の分断、B: pDW10 による第VIII染色体の分断)

【図4】 pDW18 による第XI染色体の分断染色体の確認

左2レーンがエチジウムブロマイドによる染色体断片の染色、右4レーンが サザンブロッティングの結果を使用プローブ毎にまとめたもの。中2レーンはURA3遺伝子断片(1.1 kb)をプローブにして行ったサザンブロッティングの結果、そして右2レーンはGCN3遺

伝子断片(3.3 kb)をプローブにして行ったサザンブロッティングの結果である。左より2レーン毎に、レーン1が親株、レーン2が染色体分断化クローンである。

【図5】 pDW10 による第VIII染色体の分断染色体の確認

左2レーンがエチジウムブロマイドによる染色体断片の染色、右4レーンがサザンブロッティングの結果を使用プローブ毎にまとめたもの。中2レーンはURA3遺伝子断片(1.1 kb)をプローブにして行ったサザンブロッティングの結果、そして右2レーンはYHR088遺伝子断片(3.7 kb)をプローブにして行ったサザンブロッティングの結果である。左より2レーン毎に、レーン1が親株、レーン2が染色体分断化クローンである。

【図6】 染色体が分断化されたクローンと親株の増殖比較

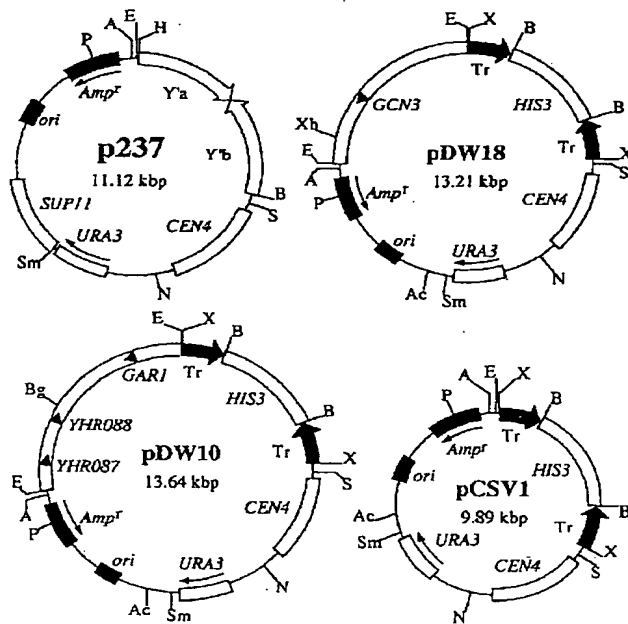
○: YPH80 (親株)

△: YMH431 (第XI染色体分断化クローン)

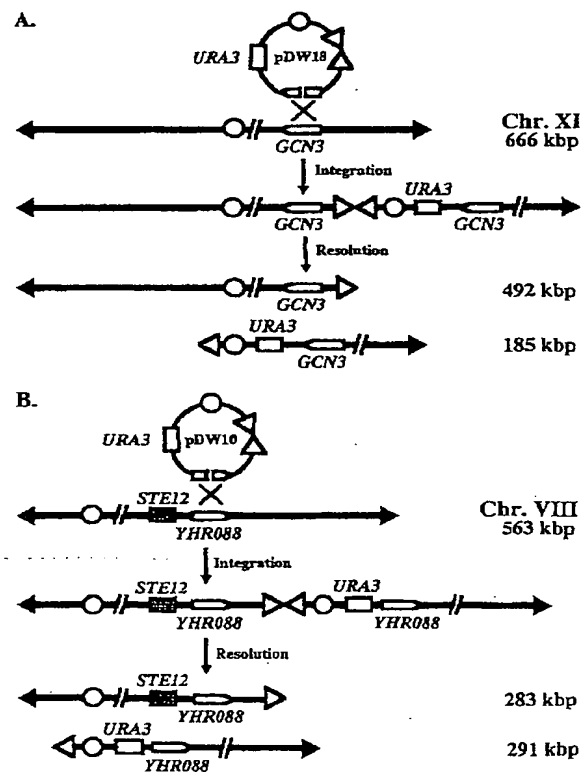
□: YMH432 (第VIII染色体分断化クローン)

縦軸: 培地の菌体濁度、横軸: 培養時間

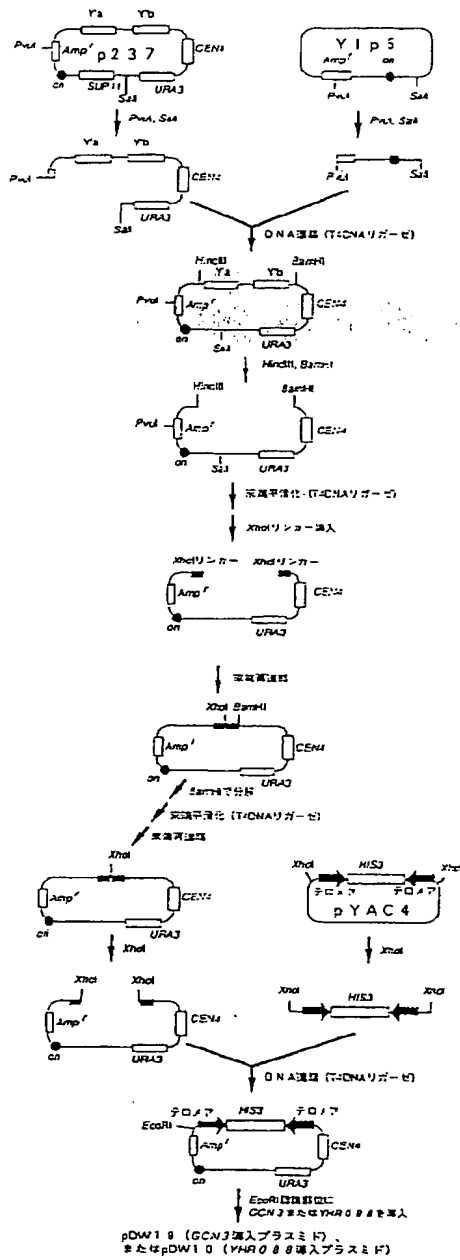
【図1】



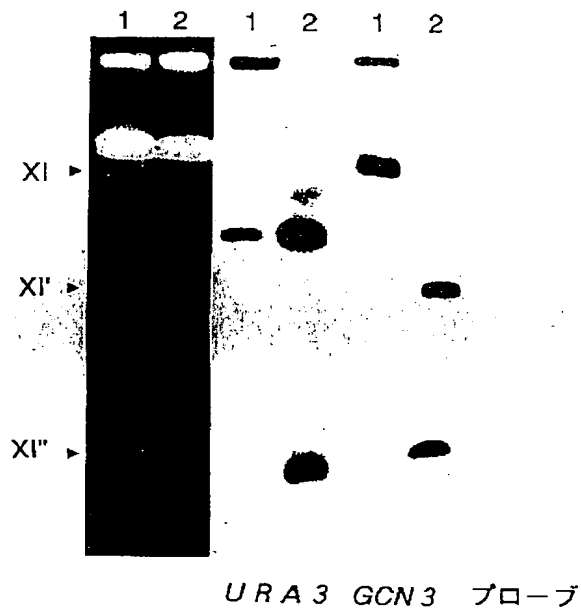
【図3】



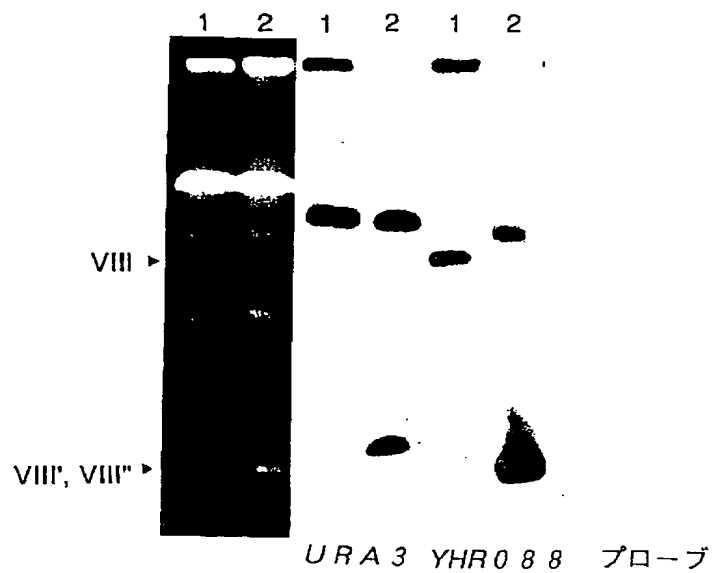
【図2】



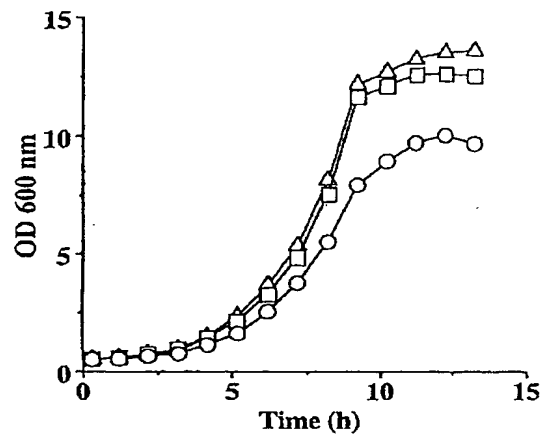
【図4】



【図5】



【図6】



【手続補正書】

【提出日】平成8年9月20日

【手続補正1】

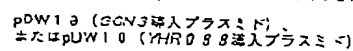
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図2

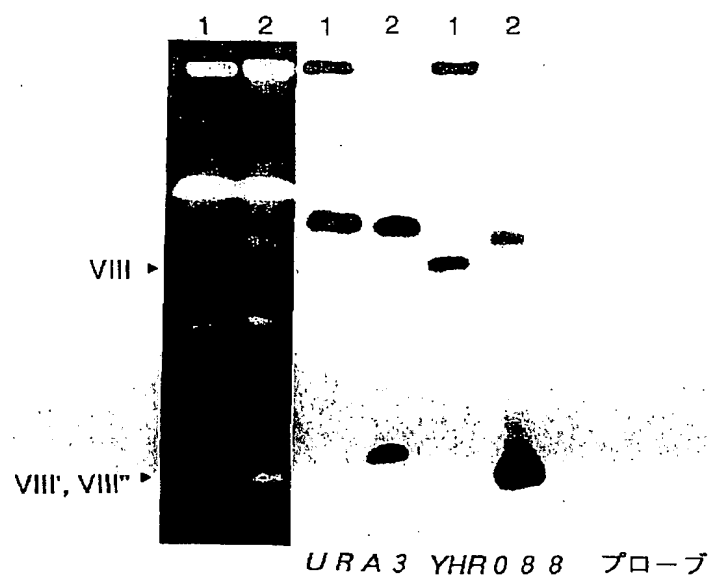
【補正方法】変更

【補正内容】

【図2】



【図5】



フロントページの続き

(72)発明者 佐野 公一郎
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の
素株式会社食品総合研究所内

(72)発明者 脊黒 勝也
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の
素株式会社食品総合研究所内